

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté pour l'obtention du DIPLÔME de Master

Spécialisation : Agronomie et Agro-alimentaire

Option : Semences et Plants Méditerranéens et Tropicaux

DIVERSITE DU SYSTEME RACINAIRE DE VARIETES DE RIZ APPARTENANT A LA SOUS ESPECE *JAPONICA* TROPICAL

Par

Jean-Thierry OURA

Année de soutenance : 2011

Organisme d'accueil : BIOS-PAM

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté pour l'obtention du DIPLÔME de Master

Spécialisation : Agronomie et Agro-alimentaire

Option : Semences et Plants Méditerranéens et Tropicaux

DIVERSITE DU SYSTEME RACINAIRE DE VARIETES DE RIZ APPARTENANT A LA SOUS ESPECE *JAPONICA* TROPICAL

Par

Jean-Thierry OURA

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Alain AUDEBERT

Dr Brigitte COURTOIS

Dr Dominique THIS

Présenté le : 22/09/2011

devant le Jury :

- nom 1

- nom 2

Organisme d'accueil : BIOS-PAM

Maître de Stage : Alain AUDEBERT

Abstract :

In a climate change context, breeding for root architecture is a promising approach to improve water use efficiency and drought resistance in cereals. Establishing a deep root system before a drought spell occurs is an efficient strategy for rainfed rice in most agronomical situations. The aim of the work was to understand the genetic bases of root architectural traits through association study.

We used an association panel of 200 tropical japonica rice varieties already characterized with 22 SSR markers that will be genotyped with 1 million SNP markers. The panel was phenotyped in an alpha lattice design with 2 replications in the “Rhizoscope” root phenotyping system. It enabled to measure mature root system (up to 45 days) under growth chamber conditions in a mixed-hydroponic system with glass beads as inert substrate.

The panel variability for root depth, root cone angle, thickness, number, dry mass at different depths was analysed. Resulting phenotypic variability groups were compared to the corresponding genetic structure. The "traditional and improved" groups distinguish themselves, so showing the weak integration of the roots traits in the breeding programs.

Panel variability and the absence of link between phenotype and genetic structures make this panel a good choice for association studies and future breeding programs for drought resistance.

Keywords:

Association studies; *Oryza Sativa Japonica*; Phenotyping; Root architecture; Rice

Résumé :

Dans le contexte actuel de changement climatique, la sélection variétale par le système racinaire est une approche prometteuse pour améliorer l'efficacité de l'eau et la résistance à la sécheresse des céréales. L'existence d'un système racinaire profond avant une période de sécheresse est une stratégie efficace pour le riz pluvial dans la plupart des situations agronomiques. Le but du travail était de comprendre les bases génétiques des caractères architecturaux racinaires par l'étude d'association.

Nous avons utilisé un panel d'association de 200 variétés de riz japonica tropicale caractérisées avec 22 marqueurs SSR qui seront génotypés avec 1 million de marqueurs SNP. Ce panel de variété a été phénotypé dans un dispositif alpha lattice à 2 répétitions avec le système de phénotypage racinaire « Rhizoscope ». Ce système permet de caractériser le système racinaire de plante adulte (jusqu'à 40 jours) par une méthodologie associant, en chambre de culture, un système hydroponique et des billes de verre comme substrat inerte.

La variabilité du panel pour des caractères tels que la profondeur maximum, l'angle du cône racinaire, le nombre de racine en profondeur, et la matière sèche à différentes profondeurs a été analysée. Des groupes de variabilité phénotypique résultants ont été comparés à la structure génétique correspondante. Les groupes « traditionnel et amélioré » se distinguent, montrant ainsi la faible intégration des caractères racinaires dans les programmes de sélection.

La variabilité de panel et l'absence de liaison entre le phénotype et des structures génétiques font de ce panel un bon choix pour des études d'association et futurs programmes d'amélioration pour la résistance de sécheresse.

Mots-clés :

Architecture racinaire; Etude d'association; *Oryza Sativa Japonica*; Phénotypage; Riz

Sommaire

I-INTRODUCTION	1
1. Importance de la production et de la consommation mondiale du riz.....	2
2. Structure de l'espèce	2
a. Présentation de l'espèce.....	2
b. Systématique	3
c. Morphologie.....	3
3. Cycle de croissance	4
4. Les problèmes de sécheresse chez le riz.....	5
5. Intérêt des racines pour la résistance à la sécheresse du riz	5
6. Caractères racinaires à étudier	5
7. Déterminisme génétique de la morphologie du système racinaire	6
8. Etude d'association	7
9. Contexte de l'étude.....	7
10. Objectif du travail	7
II-MATERIEL ET METHODES	9
1. Description de la collection.....	9
2. Données génétiques existantes sur la collection	9
a. Evaluation phénotypique des caractères	9
b. Conditions de culture	9
a- Description de l'outil de phénotypage « Rhizoscope ».....	10
b-Dispositif expérimental	10
c. Mise en place et conduite de l'expérimentation.....	10
a)-Mise en place de la culture	10
b)-Condition de culture	11
d. Caractères mesurés	11
a)-Partie aérienne	11
b)-Partie racinaire.....	11
e. Analyses statistiques	12
a. Analyse de variance.....	12
b. Analyse multi-variée	13
c. Analyses de la structure génétique de la population	13

III-RESULTATS	14
1. Analyse de la variabilité du dispositif	14
2. Analyse des caractères et des corrélations phénotypiques	14
a. Analyse des caractères.....	14
b. Corrélations entre les caractères phénotypiques.....	15
3. Analyse multi-variées	15
a. Analyse en composante principale (ACP).....	15
4. Structure de la population.....	17
a. Détection de K optimal avec STRUCTURE	17
b. Classification avec DarWin	18
5. Facteurs explicatifs de la distribution des caractères.....	19
IV DISCUSSION DES RESULTATS.....	20
1. Evaluation de l'essai	20
2. Variabilité phénotypique des caractères.....	20
3. Caractérisation des groupes par caractères racinaires	21
V CONCLUSION	23
REFERENCES.....	24

I-INTRODUCTION

Sous contrainte environnementale, les plantes ont tendance à modifier leur fonctionnement (morphogénétique, biochimique...) afin d'optimiser leur croissance et de maintenir leur rendement. La plante tend ainsi à privilégier la croissance des organes à même de capter la ressource limitante (feuilles/lumière, racines/eau et nutriments), afin d'atteindre un nouvel équilibre fonctionnel. C'est donc une véritable stratégie que la plante met en place, à travers une réorganisation de son système photosynthétique par l'équilibre fonctionnel existant entre système racinaire et système aérien.

D'où l'importance de l'étude de la diversité racinaire des plantes en réponse aux contraintes environnementales pour en comprendre les mécanismes, puis en trouver les déterminismes génétiques dans l'objectif d'améliorer les variétés cultivées.

Dans ce contexte, le système racinaire apparaît intéressant à étudier car il contrôle la capture de l'eau et des éléments nutritifs. Différents caractères ont déjà donné lieu à de nombreuses études, comme l'élongation racinaire (O'Brien 1979), la profondeur et la densité racinaire (Ahmadi 1983), le profil d'extraction de l'eau, l'activité en profondeur et la résistance à l'arrachement (O'Toole et Bland, 1987), comme la réduction du diamètre du xylème dans les racines séminales (Richards and Passioura, 1989), le rapport racines/feuilles (Siddique et al. 1990 ; Reynold et al. 2007). De nombreux QTLs contrôlant la croissance du système racinaire ont été détectés (Champoux et al. 1995; Ray et al. 1996; Redona and Mackill 1996; Yadav et al. 1997; Price et al. 1999, 2000, 2002; Ali et al. 2000; Zheng et al. 2000, 2003; Shen et al. 2001; Zhang et al. 2001a, b; Kamoshita et al. 2002a, b; Courtois et al. 2003; Nguyen et al. 2004; Xu et al. 2004; Li et al. 2005b; Horii et al. 2006; Yue et al. 2006; MacMillan et al. 2006). Une synthèse sous forme de méta-analyse en a été effectuée (Courtois et al. 2009).

C'est dans ce contexte que le CIRAD dans le projet ORYTAGE, a mis en place un système de phénotypage moyen débit du système racinaire des céréales permettant la croissance des racines dans des plaques de plexi-glass remplies de billes de verres associé à un système hydroponique. L'objectif visé est l'étude des déterminismes génétiques des différents caractères dans le but de créer un idéotype de plantes par assemblage de gènes dont on connaît la fonction. Le riz a été choisi pour une part en sa qualité de plante modèle, mais surtout pour son importance socio-économique et pour les nombreuses connaissances déjà à disposition dans divers domaines (en agronomie, en écophysiologie et en génomique).

Le but de cette étude est de tester le système de phénotypage à grande échelle et de vérifier plus en détail l'existence d'une diversité du système racinaire à l'intérieur de la sous-espèce *japonica* tropical (*Oryza sativa*), pour différents caractères phénotypiques tels que la profondeur d'enracinement, des paramètres architecturaux au niveau du système racinaire et du système aérien.

Dans une première partie, je décrirai le contexte général et je ferai une synthèse bibliographique liée aux objectifs de mon travail. Une deuxième partie sera consacrée au matériel et méthodes de l'expérimentation et à la caractérisation des mesures effectuées. La troisième partie sera destinée au traitement et analyses des résultats qui seront discutés dans la quatrième partie.

1. Importance de la production et de la consommation mondiale du riz

Le riz (*Oryza sativa* L.) est un aliment de base dans de nombreux pays, particulièrement en Asie où il permet de nourrir 2 milliards d'êtres humains (IRRI, 2010). C'est une des cultures qui est la plus produite dans le monde, avec environ 150 millions d'ha dont 75% sont cultivés dans les régions tropicales entre le tropique du Capricorne et le tropique du Cancer (FAO, 2004). Depuis l'an 2000, la production de riz a été moins élevée que sa consommation ce qui a engendré la baisse du niveau des stocks mondiaux (FAO, 2004). Aujourd'hui plus de 925 millions de personnes souffrent de faim et de malnutrition dans le monde (FAO, 2010). La population continue d'augmenter et il faudra produire 70% de riz en plus afin de participer à l'alimentation des 1,4 milliards d'êtres humains supplémentaires prévu à l'horizon 2025 (Navarro et al. 2008). Furuya et Kohama (2005) ont prévu que le réchauffement planétaire entraînera une baisse globale de la production de riz au niveau mondial. La température devrait progresser de 1,4°C à 5,8°C au cours du 21ème siècle (Intergovernmental Panel on Climate Change 2001), cela va augmenter l'intensité et le nombre des phases de sécheresse reconnues comme étant le principal facteur abiotique responsable des baisses de rendements chez le riz (Toenniessen, 1991). Cette plante est très consommatrice en eau. Par exemple en Chine, le riz consomme 50% des ressources en eau potable (Li et al. 2004). Aujourd'hui, le développement de variétés de riz tolérantes à la sécheresse est considéré comme la meilleure façon de stabiliser la production de riz en Asie et dans d'autres régions du monde (Li et al. 2004).

2. Structure de l'espèce

a. Présentation de l'espèce

Graminée annuelle, monocotylédone d'origine tropicale appartenant de la famille des *Poaceae* à cycle court (3-4 mois), le riz est une plante autogame, semi-aquatique, héliophile et qui pousse dans une très large gamme de zones climatiques.

Cette céréale est probablement celle dotée de la plus grande diversité morpho-physiologique et adaptative (Delseny, 2000). Elle est de ce fait cultivée dans des conditions écologiques très variées : latitude de 40°C sud à 53°C Nord, altitude de 0 à 3000 m et régime hydrique allant du pluvial strict à des lames d'eau de 5m comme par exemple, dans les deltas des grands fleuves. Même si le riz peut pousser dans des environnements divers, il croîtra plus rapidement et plus vigoureusement en milieu chaud et humide. Ces caractéristiques lui permettent d'être cultivé selon différentes méthodes et dans différents écosystèmes (Courtois, 2008) :

- Riziculture irriguée, endiguée, avec parfaite maîtrise de l'eau (apport comme retrait) qui occupe 53 % des surfaces.

- Riziculture inondée, endiguée, sans maîtrise de l'eau qui peut être subdivisée en plusieurs catégories en fonction des risques plus ou moins élevés de sécheresse et/ou de submersion et de la hauteur d'eau dans la parcelle. Ce type de riziculture est très répandu au Cambodge, au nord-est de la Thaïlande, en Birmanie, au Laos ou aux Philippines. Le riz inondé y occupe entre 1/3 et plus des ¾ des rizières.
- Riziculture pluviale dont l'alimentation hydrique dépend uniquement de la pluviométrie (riziculture pluviale stricte) ou de la présence d'une nappe éventuelle (riziculture de nappe). Ce type de riziculture représente 13 % des surfaces en Asie mais respectivement 60 et 75 % en Afrique et en Amérique Latine. Il demeure une production importante dans les dernières régions enclavées, peu peuplées et peu intégrées aux marchés, où sa culture après abattis-brûlis et longue jachère en fait une production durable. Les variétés sont en général des *japonicas* tropicaux de grande taille, aux lourdes panicules, à faible tallage et puissant enracinement.
- Riziculture flottante, qui suit la crue des grands fleuves, occupant 9 % des surfaces.

b. Systématique

Le riz est une plante diploïde, à $2n = 24$ chromosomes, de génome AA, autogame, avec des allofécondations naturelles qui se produisent très rarement (moins de 1% d'allogamie).

Le riz appartient au genre *Oryzae* comprenant 24 espèces dont deux seulement sont cultivées : ***Oryza sativa* et *Oryza glaberrima*.**

➤ ***Oryza sativa*** qui regroupe la plus grande espèce des riz cultivés. Ce riz est originaire d'Asie, où il aurait été domestiqué il y a environ 8.000 ans à 10.000 ans.

➤ ***Oryza glaberrima*** est née dans la boucle du Niger, avant de se propager vers les côtes de Guinée Bissau, Zambie, Sénégal, il aurait été domestiqué il y a environ 3500 ans. *Oryza glaberrima* se différencie d'*Oryza sativa* par la longueur de la ligule, qui est tronquée. Cette espèce est limitée à l'Afrique subsaharienne. Elle est de moins en moins cultivée depuis l'introduction de l'espèce asiatique dans la région.

c. Morphologie

Oryza sativa L. est originaire d'Asie mais est répartie partout dans le monde. Elle présente une grande diversité de formes et le nombre de cultivars traditionnels peut être estimé à près de 100 000. Sa classification a débuté en 1930, sur la base des caractères des plantes et de la fertilité de leurs épillets en croisement.

C'est une espèce fortement bipolaire avec 2 groupes d'origines géographiques différentes, les *indicas* et les *japonicas*. La recombinaison entre les deux groupes n'est ni facile ni fréquente. Les travaux conduits sur la diversité génétique de l'espèce à partir de données iso-enzymatiques ont, en fait, montré l'existence de 6 groupes qui recouvrent des différences d'adaptation aux conditions hydrologiques (Glaszmann, 1987). Les groupes 1 et 6 (*indica* et *japonica*) sont numériquement les plus importants et les plus éloignées génétiquement. Les analyses génétiques ont également permis de préciser la position, dans cette

classification, du groupe *javanica* comprenant, entre autres, les riz pluviaux (Glaszmann, 1988). Considéré par certains comme un groupe à part, voire comme un sous-groupe des *indicas*, le groupe *javanica* constitue en fait le sous-ensemble tropical du groupe *japonica*.

3. Cycle de croissance

- **Les racines:** Le système racinaire assure plusieurs fonctions vitales de la plante incluant l'ancrage dans le milieu et l'apport en eau et en nutriments. Il y a une corrélation forte entre la taille du système racinaire et la tolérance au stress hydrique (de Dorlodot et al. 2007) Richards 2008.

Le riz possède de nombreuses originalités au niveau de l'architecture racinaire et également au niveau de la structure et du fonctionnement des méristèmes racinaires qui ne peuvent pas être étudiées chez *A. thaliana*, en particulier un système racinaire fasciculé très majoritairement post-embryonnaire résultant de la production de nombreux primordia de racines adventives ou nodales (Rebouillat et al., 2009).

Chez le riz, on distingue deux catégories de racines, les racines séminales, qui proviennent de la semence, et les racines nodales, qui se développent généralement à partir du plateau de tallage. A partir des racines séminales et nodales poussent des racines plus fines appelées ramifications ou radicelles. Les racines séminales et les racines latérales dégénèrent rapidement, tandis que des couronnes de racines apparaissent successivement à chaque nœud du bas de la tige.

Sur le plan anatomique, le système racinaire du riz se compose de l'intérieur vers l'extérieur d'un parenchyme cortical, d'un phloème, sclérenchyme, d'un xylème

- ✓ Le parenchyme, cellules peu différenciées à paroi primaire mince et flexible, effectuant la plupart des fonctions métaboliques (synthèses et photosynthèse),
 - ✓ Phloème, cellules conductrice (sucre et matières organiques)
 - ✓ Sclérenchyme, cellules de soutien des parties de la plante, elle meurt en maturité
 - ✓ Xylème, cellules conductrice (eau, sels minéraux)
- **Les talles :** Une talle est une pousse qui comporte des racines, une tige et des feuilles. Elle peut porter ou non une panicule (talle fertile ou stérile). C'est l'ensemble de ces talles qui constitue à partir d'un seul plant la touffe du riz. L'importance des talles est fonction, des variétés de l'espacement, de la saison et de l'azote.
 - **Les feuilles:** Les feuilles se développent alternativement sur le chaume, une à chaque nœud. La feuille qui émerge après toutes les autres juste sous la panicule est appelée feuille paniculaire ou « drapeau ». La feuille se compose de limbe, de la gaine, de la ligule et de l'auricule.
 - **La panicule:** C'est le nom donné à l'inflorescence du riz qui est portée par le dernier entre-nœud du chaume. Elle se compose d'une base (cou paniculaire), d'un axe des branches primaires et secondaire, des pédicelles et des épillets.
 - **Les épillets :** C'est l'unité basale de l'inflorescence. Chaque épillet fécondé donnera un grain.

4. Les problèmes de sécheresse chez le riz

Le riz reste très sensible au stress hydrique, notamment au cours de sa période de floraison puisqu'un déficit hydrique à ce moment du cycle entraîne un avortement des grains, donc des pertes de rendements importantes.

Un stress hydrique précoce chez le riz se traduit par une réduction de la croissance de la plante et de sa production par rapport au potentiel du génotype. Il affecte en parallèle la croissance des racines et des parties aériennes, et le développement des organes reproducteurs (Debaeke et al. 1996).

Le rendement en grains chez le riz dépend fortement du nombre de grains par panicule, du poids de grains par panicule. L'effet du déficit hydrique sur ces composantes et par conséquent sur le rendement, dépend du stade au cours duquel ce déficit survient (Debaeke et al. 1996). Au cours du remplissage des grains, le manque d'eau a pour conséquence une réduction de la taille des grains (échaudage), réduisant par conséquent le rendement (Gate et al, 1993).

Par ailleurs et pour bien se développer, la plante doit disposer de mécanismes d'adaptation qui lui permettent de supporter le stress hydrique.

5. Intérêt des racines pour la résistance à la sécheresse du riz

Les racines jouent un rôle important dans le transfert de l'eau du sol vers les parties aériennes des plantes dans la réponse à la sécheresse. Pour réduire les effets de sécheresse, outre la stratégie d'évitement qui permet à la plante d'éviter une baisse de son potentiel hydrique et de maintenir une bonne turgescence lorsque que le sol subit une baisse de son potentiel hydrique, la tolérance, permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique,

Ahmad (1983) a montré que la profondeur d'enracinement et la densité racinaire jouent un rôle important dans le maintien d'approvisionnement en eau d'une plante soumise à la sécheresse. Certaines recherches ont montrée que l'angle des racines séminales favorise l'extraction de l'eau (Nakamoto and Oyanagi, 1994 ; Manshadi et al. 2006).

Le développement racinaire peut ainsi être considéré comme l'un des facteurs déterminant dans la variabilité inter- et intra-spécifique concernant la tolérance au stress hydrique chez le riz.

6. Caractères racinaires à étudier

Les racines du riz sont caractérisées par un système racinaire superficiel et assez développé contrairement à d'autres espèces céréales telles que le sorgho ou le maïs.

Une variation génétique significative entre variétés a, cependant, été observée pour des caractères morphologiques comme le nombre de racines, leur diamètre, la profondeur atteinte, la ramification, la

distribution de la densité et le rapport masse racinaire sur masse de la partie aérienne ainsi que pour des caractères liés à l'activité racinaire comme le profil d'extraction de l'eau, l'activité en profondeur et la résistance à l'arrachement (O'Toole et Bland, 1987). Plusieurs études ont porté sur les différents caractères morphologiques du système racinaire des plantes en particulier chez le riz (Wade et al. 2000 ; Azhiri-Sigari et al. 2000 ; Samson et al. 2002).

L'architecture du système racinaire joue un rôle important dans l'acquisition des ressources en eau du sol et des éléments nutritifs (Lynch, 1995 ; Yamauchi et al. 1996 ; Fitter, 2002 ; Wang et al. 2006).

Parmi les caractères morphologiques du système racinaire du riz étudiés :

- la longueur maximale et la densité du système racinaire jouent un rôle important dans l'acquisition des ressources en eau du sol et des éléments nutritifs (Sharp et Davis, 1985),
- De la même façon, Kato et al. (2006) ont montré que l'angle racinaire à partir des racines nodales a un impact important sur la profondeur d'enracinement.

7. Déterminisme génétique de la morphologie du système racinaire

De nombreux caractères agronomiques importants tels que le rendement, la qualité et la résistance aux différents stress abiotiques ou la morphologie du système racinaire sont connus comme des caractères quantitatifs. De tels caractères sont gouvernés par plusieurs gènes (système polygénique, multi-locus) et influencés par des effets environnementaux. Les régions au sein du génome contenant des gènes associés à ces caractères particuliers sont connues comme des QTLs (Quantitative Trait Loci). Les techniques de marquage moléculaire permettent de localiser ces gènes ou ces régions chromosomiques et de mieux comprendre le déterminisme génétique de ces caractères complexes. Les marqueurs moléculaires étroitement liés à ces gènes peuvent être également utilisés dans la sélection variétale, c'est la sélection assistée par marqueur (SAM).

Les détections de QTLs nécessitent un déséquilibre de liaison entre QTLs et marqueurs qui sont fonction de la distance physique qui les séparent le long du chromosome. La liaison est d'autant plus forte que cette distance est faible. La détection de QTLs requiert :

- Une descendance en ségrégation exprimant le déséquilibre de liaison.
- La mesure du caractère quantitatif pour chacun des individus de la descendance (phénotypage)
- L'identification du génotype de tous les descendants pour les marqueurs choisis (génotypage)
- La mise en œuvre des méthodes biométriques pour rechercher les locus marqueurs dont le génotype est corrélé au caractère phénotype, et estimer les paramètres génétiques des QTLs détectés.

Cette méthode a permis de grands progrès dans la compréhension du déterminisme génétique des caractères quantitatifs mais pêche par son imprécision. En effet, avec la taille usuelle des populations de cartographie (100 à 150 individus), il est difficile de localiser les QTLs dans des intervalles de confiance de taille inférieure à 5 à 20 cM.

8. Etude d'association

La détection de QTLs repose sur la création, par le biais de croisements contrôlés, d'un déséquilibre de liaison (DL) fort entre gènes et marqueurs qui donnent une valeur prédictive des allèles aux marqueurs sur les allèles aux QTLs dans la descendance des croisements. C'est l'intensité de ce DL qui crée l'intervalle de confiance sur la position des QTLs et la faible précision de leur localisation. Les études d'association recherchent une liaison statistique entre un polymorphisme moléculaire et une variation phénotypique dans une collection d'individus qui sont le produit d'un grand nombre de générations de recombinaisons et donc dans laquelle le déséquilibre de liaison s'étend sur une distance beaucoup plus courte

Par ailleurs, les études d'association permettent de comparer entre eux une large gamme d'allèles alors que dans les populations de cartographie, le nombre est réduit à 2.

L'inconvénient principal de la méthode est qu'il est alors nécessaire de disposer de marqueurs en très grand nombre de manière à atteindre une densité équivalente à celle de la maille du DL.

9. Contexte de l'étude

Dans un contexte de changement climatique, le riz, plante essentielle pour l'alimentation humaine, est confronté aux différents problèmes de sécheresse. La création de variétés de riz résistante à la sécheresse passe par la recherche.

Le riz fait l'objet de très gros effort de séquençage avec deux génomes qui ont été séquencés, de nombreux polymorphismes de séquençages (SNPs) ont été identifiés. Une puce à 1 million de SNPs est en cours de construction. Il est prévu de génotyper 2500 accessions avec cette puce. Il est donc envisageable de faire des études d'association au niveau du génome entier

C'est dans ce contexte que le CIRAD avec le projet ORYTAGE a depuis entrepris de caractériser la diversité et la structure du système racinaire du riz au sein d'une collection de 200 variétés de la sous espèce *japonica* tropical par un système de phénotypage moyen débit et l'étude de son déterminisme génétique.

10. Objectif du travail

L'objectif de notre étude est d'évaluer la diversité des caractères racinaires héréditaires dans une collection de 200 variétés de la sous espèce *japonica* tropical (*Oryza sativa*) à partir du phénotypage d'un jeu de caractères pertinents. Il s'agira de quantifier et qualifier la diversité phénotypique phénotypique (allocations de biomasse, architecture racinaire, aérienne) ;

En termes de données de génotypage, la collection a été caractérisée avec 25 marqueurs microsatellites et la structure de la population étudiée. Les liens entre diversité phénotypique et structure génétique ont donc été explorés. En revanche, les données de la puce n'étant pas disponibles, il n'a pas été possible d'aller plus loin et de faire l'étude d'association.

II-MATERIEL ET METHODES

1. Description de la collection

Le matériel végétal initial provient d'une collection de riz (*Oryza sativa*) de la sous espèce *japonica* tropical qui a été fourni par Alain AUDEBERT et Brigitte COURTOIS (CIRAD, Montpellier). Les 200 accessions sont originaires de différents pays de la zone tropicale. Il s'agit pour partie de variétés traditionnelles, pour partie de variétés améliorées. Ce matériel a été utilisé au CIRAD dans le cadre d'autres activités du projet ORYTAGE.

L'essai expérimental comprenait deux dates de semis en avril et juin 2011.

En raison des limites du système expérimental, 170 variétés de riz de la sous espèce *japonica* tropical (voir annexe) ont été utilisées (168 variétés + 2 témoins, Azucena et IR64).

➤ AZUCENA : variété pluviale traditionnelle *japonica* tropicale, à panicules lourdes. Sa hauteur moyenne à maturité est de 150 cm et elle est caractérisée par un cycle végétatif de 130 à 150 jours, une capacité de tallage faible, un système racinaire long (profond), et aux racines épaisses et peu nombreuses.

➤ IR64 : variété irriguée améliorée, de la sous espèce *indica*, produite par l'IRRI. C'est une variété semi-naine d'une hauteur moyenne de 90cm à maturité, caractérisée par un cycle végétatif de 120 jours. C'est une variété à fort tallage qui présente un système racinaire superficiel aux racines fines et nombreuses.

2. Données génétiques existantes sur la collection

Chaque individu a été génotypé à l'aide de marqueurs microsatellites. Vingt-cinq loci SSRs préalablement définis ont ainsi été passés sur le génome de chacune des accessions. Ces données étaient disponibles lors de mon arrivée en stage. La puce à 1 million de SNPs permettant un génotypage à très haute densité n'était pas encore disponible lors de la rédaction de mon mémoire.

a. Evaluation phénotypique des caractères

Les caractères racinaires et aériens associés au développement de la plante ont été observés chez les 168 variétés et chez les 2 plantes témoins (Azucena et IR64) dans les mêmes conditions de culture. Les variétés témoins ont été répétées dans chaque sous-bloc c'est-à-dire 24 fois durant le processus expérimental.

b. Conditions de culture

Le sol étant la principale contrainte pour étudier des caractères du système racinaire, on cherche à l'éliminer. Pour ce type d'étude, l'utilisation des conditions de milieu hydroponique est nécessaire. Ces

conditions de culture permettent de contrôler avec précision la nutrition minérale, et d'obtenir la totalité des racines. De plus celles-ci sont saines et exemptes de toutes infections.

a- Description de l'outil de phénotypage « Rhizoscope »

Le principe est basé sur un système hydroponie avec substrat inerte qui oppose une force de résistance à la pénétration racinaire. Ce substrat inerte constitué de billes de verre est pris en sandwich entre deux plaques transparentes de plexiglas. Ce système présente l'avantage de se libérer des difficultés associées à l'absence de visibilité des racines et à l'élimination du substrat dans un système utilisant le sol.

La plaque (Rhizoboite) est l'unité de base. Ces rhizoboites sont de forme rectangulaires et de dimension 50cm x 20cm x 2,5cm. Ces dimensions permettent d'obtenir des systèmes racinaires de plantes de 20 à 40 jours pour le riz. De plus elle écrase le système racinaire sur 2 dimensions pour une meilleure visualisation. En fin d'expérience, les billes sont éliminées par une trappe qui ferme le fond de la rhizoboite. La totalité du système racinaire maintenu en position grâce à un maillage de clous est alors disponible pour les mesures.

Le Rhizoscope est constitué de 192 rhizoboites réparties dans 4 bacs (48*4). Les rhizoboites baignent dans la solution nutritive. Pour éviter toutes différences de condition de nutrition, la solution hydroponique qui circule entre les 4 bacs est également forcée dans chaque rhizoboites avec un débit de 1.5 l/minute).

Le pH de la solution nutritive est contrôlé automatiquement et sa température est maintenue constante à 26 °C.

Cet outil permet de visualiser l'ensemble du système racinaire et permet d'atteindre certaines caractéristiques morphologiques du système racinaire tel que les différentes ramifications et le positionnement de la racine principale (J. Busch et al. 2006).

b-Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est un α -plan ou alpha-lattice qui permet de contrôler plus finement la variabilité du milieu. Quatre blocs (correspondant aux bacs) avec 48 plaques chacun ont été utilisés. Chaque bloc est divisé en trois sous-blocs. L'expérimentation a été faite en 2 répétitions décalées dans le temps. Deux variétés témoins répétées dans chaque sous-bloc ont été utilisées pour intégrer les variabilités inter-bloc et inter expérimentation.

c. Mise en place et conduite de l'expérimentation

a)-Mise en place de la culture

Les semences des variétés sont tout d'abord mises à pré-germer 72 heures dans une étuve éclairée de germination à une température de 30°C (5 graines sur papier filtre humidifié dans des boîtes de Pétri).

A ce stade la coléoptile et l'hypocotyle sont suffisamment bien développés pour procéder au repiquage. Les plantules sont placées au centre des rhizoboîtes à une profondeur d'environ 5-10 mm.

b)-Condition de culture

Les plantes sont nourries à l'aide d'une solution nutritive composée de 0,5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,6mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,7mM KNO_3 ; 10 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,7 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 22,6 μM H_3BO_3 ; 100 μM FeEDTA; 0,4mM KH_2PO_4 .

La température de la solution hydroponique est maintenue à 26°C et le pH de la solution nutritive est ajustée à 5,5 jusqu'à la fin de la manipulation.

On procède tout au long de la phase végétative à une prise quotidienne de la température de l'air, du rayonnement global et de l'humidité. On a appliqué une photopériode de 12h de jour et de 12 h de nuit dans le phytotron.

Sur toute l'expérience, la température a été maintenue à 28°C le jour et de 25°C la nuit, le rayonnement est maintenu à 400-450 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et l'humidité relative de 55%.

d. Caractères mesurés

a)-Partie aérienne

La veille du prélèvement, les caractères aériens ont été mesurés (Longueur de la plus grande feuille, nombre de feuille et nombre de talles).

b)-Partie racinaire

Après élimination des billes les mesures du système racinaire portent sur la profondeur maximale, le nombre de racine à 30 cm de profondeur et l'angle du cône racinaire. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour mesurer l'angle racinaire. Par des calculs trigonométriques nous avons calculés l'angle racinaire.

Les racines sont ensuite nettoyées pour enlever les dernières billes prises dans le chevelu racinaire puis découpées selon la profondeur. Trois échantillons sont réalisés 0-20 cm; 20-30 cm et 30-50 cm. Les différents échantillons (aériens et racinaires) sont placés à l'étuve (65 °C pendant 7 jours) avant pesée de la matière sèche.

Tableau I. Liste des différentes variables mesurées et calculées

Variables mesurées	
Partie aérienne	
Longueur feuille (cm)	Lf
Nombre de talles	Nt
Nombre de feuilles	Nf
Matière sèche système aérienne (g)	Msae
Partie racinaire	
Profondeur (cm)	Profondeur
Nb racine à 30 cm	Nbr_30cm
Longueur étirée	Long
Angle racinaire (α)	Angle(α)
Matière sèche système racinaire 0-20 (g)	Msr1
Matière sèche système racinaire 20-30 (g)	Msr2
Matière sèche système racinaire 30-50 (g)	Msr3
Variables calculées	
Matière sèche racinaire totale	Msr _{tot} (g)
Matière sèche totale	Mst(g)
Rapport MS racinaire/aérienne	R/S

e. Analyses statistiques

a. Analyse de variance

L'analyse de variance des caractères a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (SAS Institut Inc., Cary, NC, USA). Un seuil de 5% a été retenu.

Des effets des répétitions, blocs, sous-blocs, variétés et témoins ont été considérés. Le modèle utilisée était un modèle mixte. Les effets variétés, bloc dans REP, sous-bloc dans bloc*REP, témoin et rep*témoin ont été considérés comme fixes et ont pu être testés. Les autres effets (interactions notamment) ont été considérés comme aléatoires. L'analyse de variance a permis de calculer des moyennes ajustées tenant compte de la variation entre sous-blocs.

↳ Héritabilité au sens large

L'héritabilité au sens large définit la part de la variance génétique dans la variance phénotypique. L'héritabilité (h^2) pour les caractères quantitatifs étudiés a été calculée à partir des variances génétiques (σ_g^2) et résiduelle (σ_e^2) issues des espérances des carrées moyens de l'analyse de variance.

$$H^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/n)]$$

avec **n**, nombre de répétitions

b. Analyse multi-variée

↳ **Analyse en Composante Principale**

Les données ont été analysées par le logiciel XLSTAT 2011 pour générer une représentation bidimensionnelle des variables calculées et mesurées. L'analyse en composante principale ACP permet de visualiser le lien entre les variables ainsi que la contribution des variétés dans cette représentation.

c. Analyses de la structure génétique de la population

a)_DarWin

Une matrice de dissimilarité a été calculée avec un indice du "simple matching" avec le logiciel DarWin (logiciel réalisé au CIRAD <http://darwin.cirad.fr/darwin/Home.php>). Puis une analyse de Neighbor-Joining (NJ) a été réalisée. Cette méthode de NJ consiste à calculer des matrices successives de distances qui prennent en compte les divergences moyennes de chacun des individus avec les autres. Un arbre est alors construit en reliant les individus les plus proches par des nœuds.

b)-Structure

L'analyse de la structure de la population consiste dans le présent cas à déterminer K, le nombre de groupes génétiquement différents (sous-populations) observés dans notre échantillon de lignées. Nous avons procédé à l'analyse avec le logiciel STRUCTURE en choisissant les paramètres de mélange entre populations et de corrélation entre fréquences alléliques (Falush et al. 2003). Nous avons testé des valeurs de K variant de 1 à 10, avec 10 répétitions de chaque valeur de K afin de tester la reproductibilité des résultats.

Chaque test comportait 100.000 burn-in et 100.000 itérations. La détermination de la valeur de K la plus probable a été faite en utilisant la méthode d'Evanno et al.

III-RESULTATS

1. Analyse de la variabilité du dispositif

La croissance des pousses et des racines a été soigneusement testée dans le système. Nous avons observé une variation génotypique dans la dynamique de croissance des racines et des parties aériennes. Sur la base de deux répétitions et du nombre élevé des variétés à tester, nous avons voulu dans une première analyse de la variance évaluer l'importance des différents effets contrôlés (l'effet REP, l'effet bloc dans REP et l'effet sous-bloc dans bloc*REP, l'effet témoin et l'effet variété) pour chacun des caractères étudiés (**Tableau 2**). On observe que l'effet REP est significatif pour 11 caractères ($p < 0,05$) sur un total de 14 caractères testés. L'analyse de la variance révèle également un effet bloc(REP) très hautement significatif pour 11 caractères ($p < 0,001$) et non significatif pour seulement 3 caractères (Angle(α), R_S, Nf). Nous observons un effet sous-bloc significatif au seuil de 1% pour seulement 3 caractères sur les 14 testés. Le contrôle du sous-bloc ne sera donc pas indispensable dans le futur. Les deux témoins, supposé représenter deux extrêmes, ont été bien choisis puisque l'effet témoin est très hautement significatif ($p < 0,001$) sauf pour l'angle du cône racinaire. L'interaction répétition*témoin est non significative dans la plupart des cas.

L'effet génotype, lui, est très hautement significatif pour tous les caractères ($p < 0,001$) sauf le nombre de feuilles ($p < 0,05$).

On observe que l'ensemble des caractères sauf le nombre de feuilles et le nombre de talles ont des héritabilités élevées ($h^2 > 0,66$). Tous les caractères liés à la profondeur racinaire sont des caractères héréditaires : Angle (α) ($h^2 = 0,75$), Long ($h^2 = 85$), Profondeur ($h^2 = 0,81$), Msr3 ($h^2 = 0,83$).

Cette analyse de la variance nous a permis d'obtenir des moyennes ajustées sur lesquelles nous ferons l'analyse des caractères et l'analyse des corrélations.

2. Analyse des caractères et des corrélations phénotypiques

a. Analyse des caractères

Dans cette analyse portant sur les moyennes ajustées, nous allons nous focaliser sur les caractères qui nous semblent intéressants dans un contexte de résistance à la sécheresse. Les principales caractéristiques des variables (moyenne, écart-type et coefficient de variance) sont récapitulées dans le **Tableau 3**.

Le coefficient de variation (CV) montre une grande variation pour le Nbr_30cm (nombre de racines à 30cm), Msr2 (matière sèche racinaire de 20-30cm), Msr3 (matière sèche racinaire de 30-50cm), (Cv : 57,8%, 52,2% et 104,5% respectivement). L'angle (α), la profondeur, R_S ont un coefficient de variation plus faible (CV : 15,3%, 13,4%, 15,0% respectivement); Msr1, Msae, Msrtot, et Mst présentent une gamme de variation intermédiaire (CV : 32,7%, 32,8%, 34, 5%, 32,6%).

La distribution des matières sèches racinaires et matières aériennes de l'ensemble des variables semble suivre une loi normale (**Figure 1**).

b. Corrélations entre les caractères phénotypiques

Les coefficients de corrélation de Pearson entre différents caractères phénotypiques ont été calculés. Des corrélations significatives (au seuil de 5%) sont observées entre différentes variables. Cette analyse de corrélation révèle que tous les caractères racinaires sont significativement corrélés entre eux et que toutes les variables matières sèches racinaires sont aussi corrélées entre elles (**Tableau 4**).

On observe que l'Angle (α) racinaire est faiblement corrélé avec la profondeur ($r^2=0,3^{**}$, $p<0,01$) et que cette corrélation est positive alors qu'on s'attendrait à une corrélation négative si l'angle du cône racinaire était un bon prédicteur de la profondeur. On observe une forte corrélation entre Msrtot et Msae ($r^2=0,882^{**}$, $p<0,01$). On observe une forte corrélation entre Mst et la Msae ($r^2=0,882^{**}$, $p<0,01$). La longueur des feuilles (Lf) est corrélée avec tous les caractères racinaires.

3. Analyse multi-variées

a. Analyse en composante principale (ACP)

La Figure 2 présente le plan 1/2 d'une analyse en composante principales sur les caractères étudiés. L'axe x de l'ACP se révèle particulièrement structurant (inertie : 51,9%), et l'axe y représente 19,4% de l'inertie. A eux deux, ces deux axes résument 71,3% de la variation. Les deux axes correspondent à des comportements opposés vis-à-vis des caractères étudiés. L'axe x oppose les faibles biomasses aux fortes biomasses et l'axe y oppose les variables définissant la profondeur d'enracinement (Msrtot, Msr2, Msr3, Prof, Long, nbr_30cm) aux variables aériennes (Msae, Nbr_30cm, Lf) et aux variables racinaires superficielles (Msrtot, angle).

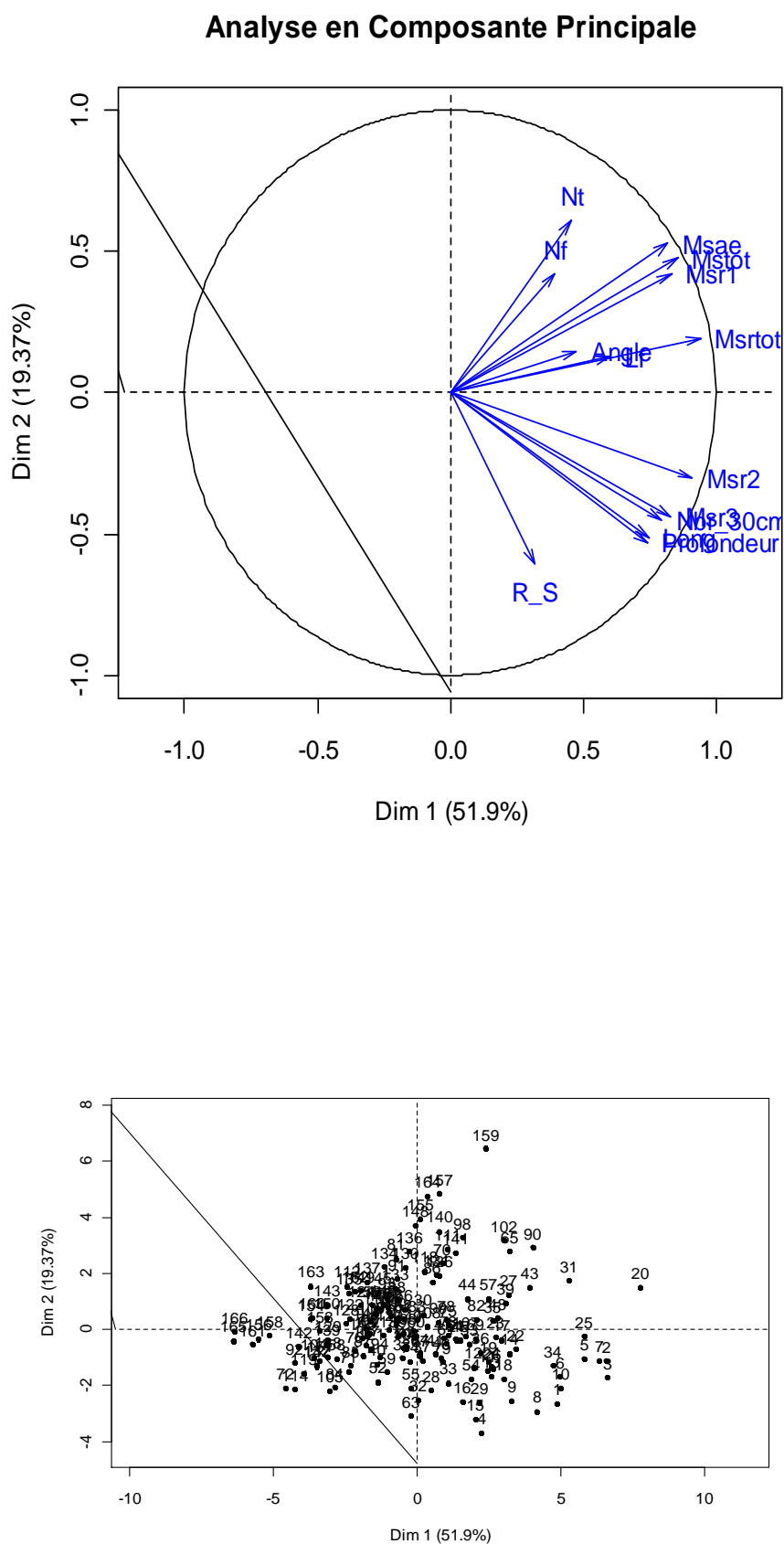


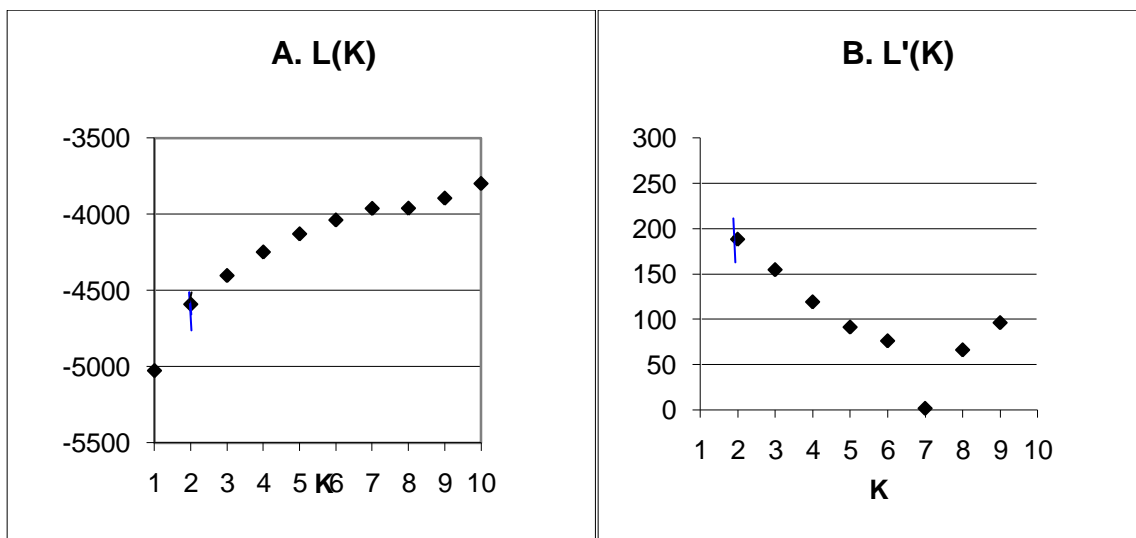
Figure2. Analyse en composante principale (ACP) des 14 caractères étudiés

4. Structure de la population

a. Détection de K optimal avec STRUCTURE

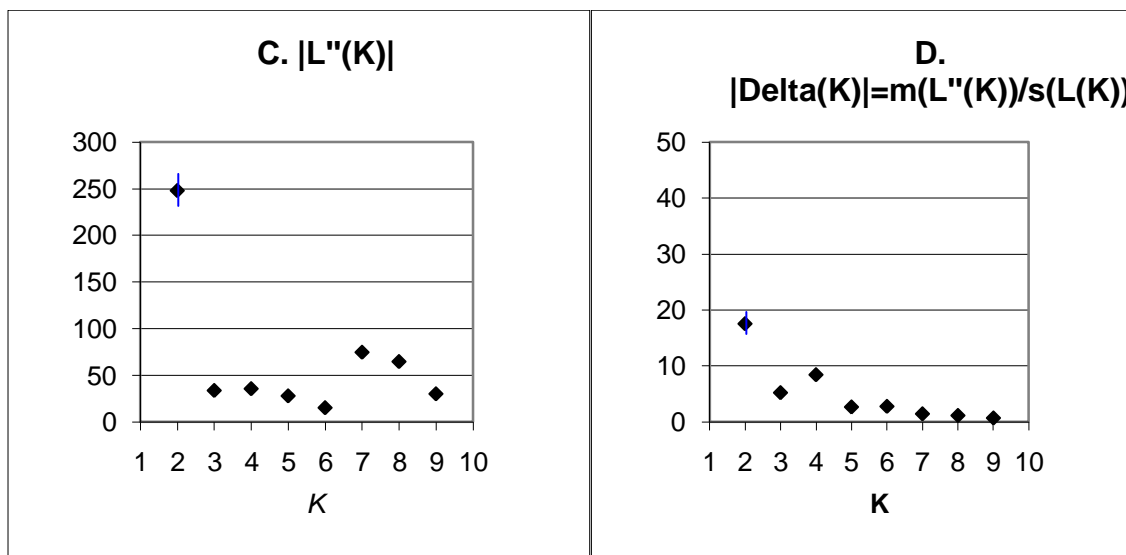
Nous avons lancé le logiciel STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000) sur une matrice comprenant 186 d'individus et 25 microsatellites SSRs dans le but de déterminer le nombre de sous populations (K) dans notre panel. Nous avons fait varier K de 1 à 10. A partir de ces simulations, nous avons estimé le log de vraisemblance, c'est-à-dire la probabilité d'observer les données sachant le nombre de groupes K [$\ln P(D)$ ou $\Pr(X|K)$].

La meilleure estimation de K est la valeur de K maximale avant le plateau de la courbe représentant $\ln P(D)$ en fonction de K (Pritchard et al. 2000). On n'observe pas de réel plateau sur la courbe de $L(K)$. Tout de même, on observe un point d'inflexion sur la courbe après la valeur $K = 2$ (**Figure 3**). Ces éléments ne sont pas suffisamment concluants quant à la détection du K optimal comme c'est souvent le cas avec des données réelles. Nous avons donc aussi déterminé la dérivée première et la dérivée seconde de ce log likelihood (**Figure 3**) qui sont les fonctions $L'(K)$ et $L''(K)$ (Evanno et al. 2005). La dérivée première comme la dérivée seconde montrent une décroissance progressive à partir de $K=2$. Le nombre de sous-populations détecté par STRUCTURE dans notre panel serait donc de 2.



I

II



III

IV

Figure3. Graphiques de l'évolution de la vraisemblance $L(K)$ ainsi que ses variations $L'(K)$ et $L''(K)$ en fonction du nombre de sous-populations

L'échantillon comporte 170 variétés de riz à 25 loci microsatellites et analysées sous STRUCTURE (Falush et al. 2003). (I) : Les points représentent la moyenne $L(K)$ du log likelihood sur 10 simulations (II) : Variation de second ordre du log likelihood $L'(K)=L(K)-L(K-1)$, (III) : Variation de la dérivée d'ordre 3 $L'''(K)=L(K)-L(K-1)$, (III) : Variation de et (IV) : $\Delta K = m|L''(K)|/s[L(K)]$ calculé selon la formule d'Evanno et al. (2005).

Le logiciel nous a également permis de calculer les pourcentages d'admixture de chaque individu c'est-à-dire les pourcentages de leur génome provenant de chaque sous-population. Nous avons ensuite assigné à une sous-population les individus qui avait plus de 80% de leur génome provenant de cette sous-population. Les individus qui ne franchissaient pas ce seuil ont été classés comme intermédiaires.

b. Classification avec DarWin

Nous avons fait une analyse de classification avec l'algorithme Neighbor Joining et projeté sur l'arbre NJ l'appartenance aux deux sous-populations. Une bonne cohérence a été observée entre les deux représentations de la diversité obtenues dans le cadre de cette étude (**Figure 4**) avec une forte structuration de la diversité à l'aide du logiciel DarWin. Le dendrogramme obtenu montre une certaine séparation des variétés traditionnelles d'Asie (Thaïlande, Laos, Vietnam, Indonésie, Népal, Inde et Bhoutan) des variétés traditionnelles provenant de l'Amérique latine, de l'Afrique centrale, de l'Afrique de l'Ouest et de Madagascar ainsi que des variétés améliorées de l'IRRI. Les variétés intermédiaires d'après Structure se retrouvent pour la plupart entre les deux groupes. (**Figure4**).

5. Facteurs explicatifs de la distribution des caractères

Cette étude a été menée pour évaluer globalement les différences caractéristiques de profondeur d'enracinement d'une population de 170 variétés de riz de la sous espèce *japonica* tropical. Nous avons caractérisé les 170 accessions de riz pour la longueur, la profondeur, la Msr1, Msr2, Msr3 (masse racinaire de 0-20cm ; 20-30cm et supérieure à 50cm respectivement), et le ratio R/S. Nous avons cherché à expliquer ces distributions en utilisant les données passeport disponible sur les variétés (pays d'origine, région agro-climatique, type variétal) et leur organisation en groupes génétiques (données issues de Structure) et en faisant une analyse de variance. Le pays, la région, le type variétal (amélioré ou traditionnel) semblent largement influencer les résultats (effets significatifs dans 60 à 70% des cas) (Tableau 5).

IV DISCUSSION DES RESULTATS

1. Evaluation de l'essai

Le dispositif expérimental utilisé pour cet essai a permis d'étudier les différents facteurs intervenant sur les caractères racinaires mesurés. L'expérimentation a montré un effet de la répétition et un effet bloc significatif sur un grand nombre de caractères mesurés (Tableau 2). L'existence de l'effet bloc a montré clairement qu'il existe une hétérogénéité spatiale dans l'enceinte du phytotron. Cette hétérogénéité résulte du fait que la température est plus élevée dans une zone du phytotron correspondant plus ou moins à un bloc (données non présentées). Ce phénomène peut être expliqué par la grande taille du phytotron (40m²) et par la circulation peu homogène de l'air dans l'enceinte (liée à la position des lampes et des climatiseurs). D'autre part cette enceinte est pourvue d'un humidificateur unique ne permettant pas une homogénéisation parfaite du taux d'humidité.

Le nombre de variétés testées et le système de phénotypage utilisé nous ont contraint à décaler les répétitions dans le temps (avril et juin). Malgré l'utilisation du phytotron qui devrait nous garantir des conditions de culture identiques et l'utilisation de la somme de température pour définir la date de prélèvement, les résultats montrent que le développement des plantes n'est pas semblable pour les deux répétitions (effet répétition significatif pour 11 caractères mesurés). Cet effet peut être expliqué par l'impact des conditions climatiques (température et humidité) sur la sollicitation des équipements (humidificateur et climatiseur). La somme de température reste toutefois nécessaire pour contrôler au mieux le temps de culture en relation avec le développement des plantes.

L'essai a cependant permis d'observer des différences phénotypiques significatives entre les variétés qui seraient difficiles à détecter en conditions in situ (au champ). Comparativement aux essais au champ, la conception de notre dispositif expérimental, offre l'avantage de conditions homogènes pour certains paramètres de l'environnement: maîtrise des solutions nutritives (composition, pH, température), et photopériode, même si le contrôle de l'homogénéité d'autres paramètres (lumière et température) pourrait être amélioré. Avec ces conditions de culture raisonnablement homogènes les différences entre variétés peuvent être importantes en ce qui concerne les caractères racinaires. Différents types d'architecture racinaire ont ainsi été observés (profond, superficiel, étendu etc.)

L'utilisation de l'alpha plan comme dispositif expérimental nous a également permis de corriger les effets bloc et répétition et de pouvoir travailler sur les valeurs ajustées pour étudier cette diversité du système racinaire chez la sous-espèce de riz *japonica*.

2. Variabilité phénotypique des caractères

Dans notre étude, nous avons observés que l'architecture racinaire différait nettement entre les génotypes de riz testés. Ainsi la profondeur maximale mesurée à partir du plateau de tallage était en

moyenne de 41,0 cm avec un écart type de 5,5. Pour chaque caractère mesuré il est possible de trouver des variétés fortement contrastées. La plupart des caractères présentent une distribution qui suit la loi normale. Toutefois un au moins des caractères présente une distribution s'apparentant à la loi de Poisson (Nombre de racine à 30 cm). Cette distribution peut s'expliquer par le fait qu'un grand nombre de variétés ne présente aucune racine à cette profondeur. La distribution est alors décalée vers la droite.

Le tableau des corrélations a montré que les corrélations qui existent entre les différents caractères sont toutes significatives. Des résultats similaires ont été rapportés par Champoux et al. (1995). Toutefois nous avons noté que l'angle du cône racinaire était faiblement corrélé avec la profondeur (0.3) Ce résultats est en contradiction avec les résultats obtenu en 1994 par Abe et Morita qui ont montré lors de leurs recherches sur le système racinaire du riz que la profondeur d'enracinement était favorisée par un angle racinaire aigu, donc si l'angle est trop fort la profondeur racinaire est faible. La cause de cette faible corrélation, qui plus est de sens opposé à celui attendu, vient peut être de la méthode de mesure. En prenant en compte les racines secondaires qui sont parfois présentes à l'extérieur du cône formé par les racines nodales, notre méthode de mesure utilisant un rapporteur a eu tendance à surestimer les valeurs du cône racinaire par rapport à la bibliographie. D'autre part, nous avons utilisé une seconde méthode de mesure basée sur l'empâtement du système racinaire à 10cm de profondeur. Au cours des mesures il s'est avéré que pour un certain nombre de variétés, cet empâtement avait atteint la largeur maximum de la rhizobote. Dans ce cas, la tendance a été à la sous estimation du cône racinaire. L'utilisation d'une méthode normalisée, (choix des racines nodales extérieures et usage d'un rapporteur) devrait permettre de résoudre ce point.

3. Caractérisation des groupes par caractères racinaires

Dans le cadre du projet ORYTAGE, ce phénotypage racinaire doit permettre une étude d'association avec des données de génotypage obtenues à partir d'une puce à 1 million de SNPs (génotypage en cours). En attendant que ces données de génotypage soient disponibles, nous avons essayé d'expliquer les distributions à partir de données passeport et des résultats de Struture. Les données passeport, peu détaillées, portent sur le type (variétés traditionnelle et variétés améliorées) et sur la zone de provenance (pays et région). Nos résultats ont montré que ce sont les variétés traditionnelles qui présentent les racines les plus profondes. Les variétés améliorées ne montrent pas des caractères racinaires plus performants que les variétés traditionnelles. Les caractères racinaires ne sont pas, pour l'instant, pris en compte directement dans les programmes de sélection en raison de la difficulté de les évaluer. Ces programmes se sont focalisés sur les caractères mesurables (rendement, croissance aérienne, résistance aux maladies etc. ;). La résistance à la sécheresse a certainement été un caractère pris en compte pour la sélection des variétés pluviales mais probablement de manière globale sous forme du rendement sous stress qui intègre tous les caractères de résistance à la sécheresse, dont certains négativement corrélés chez le riz. Cette sélection s'est apparemment faite au détriment du système racinaire.

L'amélioration de l'architecture du système racinaire est primordiale pour les programmes de d'amélioration des plantes pour la résistance à la sécheresse. Plusieurs études ont rapporté que l'architecture racinaire a un

impact significatif sur l'acquisition efficace de l'eau et des éléments nutritifs dans le sol (Nibau et al. 2008 ; Rengal and Damon 2008 ; Rose et al. 2009), et que, par conséquent, elle était en relation avec la productivité des plantes (Lynch, 1995). La longueur racinaire joue un rôle important dans le mécanisme de résistance à la sécheresse. Un système racinaire profond au moment de la sécheresse permet à la plante d'avoir un accès à la ressource hydrique (mécanisme d'évitement) pour peu qu'il y ait de l'eau en profondeur.

L'analyse de l'origine géographique des variétés les plus intéressantes du point de vue profondeur racinaire confirme les bonnes performances des variétés brésiliennes, ce qui était déjà connu, mais montre également, ce qui est plus original, l'intérêt des variétés indonésiennes, essentiellement des variétés dites "bulu", qui sont des variétés de culture inondée, et des variétés de Taïwan.

Nos résultats montrent également qu'il n'y a pas de lien systématique entre la structure génétique du panel d'association (les groupes de Strucutre) et la distribution des caractères racinaires. Cette situation est favorable à la réalisation d'une étude d'association. En effet, les corrections de l'effet de la structure du panel dans les études d'association nécessaires pour éviter les faux positifs, rendent la méthode inefficace si la distribution du caractère est liée à la structure.

V CONCLUSION

Notre étude a porté sur l'évaluation de la diversité des caractères racinaires dans une collection de 170 variétés de la sous espèce *japonica* tropical de riz (*Oryza sativa*). Cette étude a permis la caractérisation des racines chez le riz à partir d'un système de phénotypage moyen débit. L'utilisation d'un rhizoscope et des plaques contenant des billes de verre constituent un système utile pour l'étude de l'architecture racinaire car sa pratique permet l'obtention de la totalité du système racinaire. Nous avons observé une large gamme de variation génotypique dans l'architecture des racines et des parties aériennes.

Le développement du système aérien et la croissance des racines ont été soigneusement testés dans le système Rhizoscope. Malgré un effet répétition et bloc dus aux infrastructures utilisés pour cette étude (taille et hétérogénéité du phytotron) l'utilisation d'un dispositif expérimental adapté nous a permis d'observer l'existence d'une hétérogénéité phénotypique pour l'ensemble des caractères mesurés sur la totalité du panel.

Cette diversité de l'architecture racinaire se retrouve tant au niveau de la profondeur maximum avec des variétés présentant des racines à 50 cm de profondeur alors que d'autres ne dépassaient pas 25 cm. De la même manière certaines variétés présentaient jusqu'à 7 racines à 30 cm. Cette présence de racines aux fortes profondeurs est susceptible de donner à ces plantes de grandes capacités d'extraction en eau et en éléments minéraux.

De l'ensemble de ces résultats, une relation semble se dégager entre les caractéristiques d'enracinement, les types de variétés utilisés dans notre étude et la zone géographique de provenance. Les variétés de riz possédant le système racinaire le plus profond étaient les variétés traditionnelles, notamment celles d'Indonésie et de Taïwan. Ces variétés peuvent être considérées comme une source de variabilité génétique importante utilisable dans l'amélioration du riz surtout aux stress abiotiques.

Parmi les caractères de résistance à la sécheresse, un système racinaire puissant et profond se mettant rapidement en place en début de culture et en situation de compétition ou de stress hydrique est un caractère important pour le riz, du fait de son rôle dans la captation des ressources hydriques et minérales et dans la capacité qu'il confère à la plante de survivre à des déficits passagers de ces ressources. Une étape cruciale à l'heure actuelle consiste à comprendre le déterminisme génétique de ces caractères et identifier les gènes responsables. Les études d'association au niveau du génome entier permises par cette étude devraient y contribuer.

REFERENCES

- Ahmadi N, Courtois B, Shen L, Ghesquière A (2002) Efficiency of marker-assisted selection in rice. In: Rice genetic resources and breeding for Europe and other temperate areas. Proc. Eurorice 2001 Symposium, Krasnodar, Russie.
- Ali ML, Pathan MS, Zhang J, Bai G, Sarkarung S, Nguyen HT (2000) Mapping QTLs for root traits in a recombinant inbred population from two indica ecotypes in rice. *Theor Appl Genet* 101:756-766.
- Aranzana MJ, Lim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, Toomajan C, Traw B, Zheng H, Bergelson J, Dean C, Marjoram P, Nordborg M (2005) Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genetics*, 1(5): 1-9
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309:741-745.
- Benfey PN, Scheres B (2000) Root development. *Curr Biol* 10:R813-R815 Birnbaum K, Sasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 302:1956-1960.
- Blanc G (2006) Sélection assistée par marqueurs dans un dispositif multiparental connecté. Application au maïs et approche par simulations. Thèse INA PG. 150 p.
- Blum A, Sullivan CY (1986) The comparative drought resistance of landraces of sorghum and millet from dry and humid regions. *Annals of Botany* 57:835-846.
- Camus-Kulandaivelu L, Veyrieras JB, Madur D, Combes V, Fourmann M, Barraud S, Dubreuil P, Gouesnard B, Manicacci D, Charcosset A (2006) Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. *Genetics*, 172: 2449-2463.
- Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, O'Toole JC, Huang N, McCouch S (1995) Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor Appl Genet* 90: 969-981. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3568486>
- Chardon F, Virlon B, Moreau L, Falque M, Joets J, Decousset L, Murigneux A, Charcosset A. 2004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* 168:2169-2185. <http://www.genetics.org/content/168/4/2169.short>
- Courtois Brigitte, Nourollah Ahmadi, Farkhanda Khowaja, Adam H. Price, Jean-François Rami, Julien Frouin, Chantal Hamelin and Manuel Ruiz. Rice Root Genetic Architecture: Meta-analysis from a Drought QTL Database, Volume 2, Numbers 2-3, 115-128, DOI: 10.1007/s12284-009-9028-9. <http://www.springerlink.com/content/b2q723m2684740j4/>
- De Dorlodot S, Forster B, Pages L, Price A, Tuberosa R, Draye X. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 2007;12:474-81. <http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385%2807%2900191-4>
- J. Rebouillat, A. Dievart, J. L. Verdeil, J. Escoute, G. Giese, J. C. Breitler, P. Gantet, S. Espeout, E. Guiderdoni and C. Périn. Molecular Genetics of Rice Root Development. *Rice*, 2009, Volume 2, Number 1, Pages 15-34. <http://www.springerlink.com/content/y2r75751j6684485/fulltext.pdf>

- Hsiao TC., O'Toole JC., Yambao EB. and Turner NC., (1984). Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.*, **75** : 338-41. <http://www.springerlink.com/content/33570v275r075793/>
- Kameli A. and Lösel D.M., (1995). Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *J. Plant Physiol.*, **145**, 363-366.
- Kara Y., Martin A., Souyris I., Rekika D. and Monneveux P., (2000). Root characteristics in durum wheat (*T.turgidum* conv. *Durum*) and some wild Triticeae Species. Genetic variation and relationship with plant architecture. *Cereal Research and Communication*, **28** (3), 147-254.
- Mac Key J., (1998). Wheat domestication as shoot: Root interrelation process, *In: Proceeding of the fifth international wheat Genetics symposium*, S. RAMANUJAM ed., New-Delhi. India, 875-890.
- Price AH, Steele KA, Moore BJ, Jones R.GW (2002) Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. II. Mapping QTL for root morphology and distribution. *Field Crop Res* 76: 25-431
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67: 170-181.
- Ray JD, Yu L, McCouch SR, Champoux MC, Wang G, Nguyen HT(1996) Mapping QTL associated with root penetration ability in rice. *Theor Appl Genet*, 92:627-636.
- Rebouillat J (2006) Etude cellulaire et moléculaire du développement racinaire chez le riz (*O. sativa* L. cv Nipponbare): criblage et caractérisation d'une collection de lignées d'insertion enhancer trap gal4-uasgfp. Thèse de 3ème cycle, Université de Montpellier II, 98 p.
- Reddy AR, Ramakrishna W, Sekhar AC, Ithal N, Babu PR, Bonaldo MF, Soares MB, Bennetzen JL (2002) Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. indica cv. Nagina 22). *Genome* 45:204-211.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci* 20: 11479-11484.

